



尿のプロテオグリカンおよび酸性ムコ多糖の分画法 とウロン酸含有酸性ムコ多糖の酵素的定量法

著者	佐竹 成夫
号	1378
発行年	1982
URL	http://hdl.handle.net/10097/19446

氏 名 (本籍) さ たけ しげ お
佐 竹 成 夫

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 1 3 7 8 号

学位授与年月日 昭 和 5 7 年 2 月 2 4 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴 昭 和 4 7 年 3 月
岩手医科大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 尿のプロテオグリカンおよび酸性ムコ多糖の
分画法とウロン酸含有酸性ムコ多糖の酵素的
定量法

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教授 若 松 英 吉 教授 吉 沢 善 作

教授 菊 地 吾 郎

論文内容要旨

尿中に排泄される酸性ムコ多糖は、体内の種々の組織、特に結合組織の基質成分である酸性ムコ多糖の代謝産物である。したがって、尿の酸性ムコ多糖を分画・定量することで、体内での酸性ムコ多糖代謝の状態をある程度把握することが可能と思われる。近年、ムコ多糖代謝異常症やある種の結合組織性疾患において、尿中酸性ムコ多糖の異常排泄がみられることがわかり、尿の酸性ムコ多糖の簡便な分画・定量法が望まれるようになった。一方、尿中酸性ムコ多糖の分画・定量に用いられてきたこれまでの各種の分析法は、一般的な臨床検査に適用するには難点が多かった。そこで著者は、尿中のウロン酸含有酸性ムコ多糖の分画・定量用として、一般病院の臨床検査レベルでも十分実施可能な簡便な方法の開発を試み、新たに、尿中のTCA不溶プロテオグリカン（ペプチドグリカン）とTCA可溶性酸性ムコ多糖の分画法を確立すると共に、各種酸性ムコ多糖分解酵素によるウロン酸含有酸性ムコ多糖の新定量法を開発した。

方 法

a) 試料尿：被検者の24時間尿を集め、全尿量を計量後約200 mlを正確に測定し試料尿とした。
b) 酸性ムコ多糖の分離・分画：試料尿に等量の水を加えて希釈した後、透析することなく直接セチルピリジニウムクロリド（CPC）溶液を加えて尿中の酸性ムコ多糖を沈殿させ、それを酢酸カリウム溶液に溶かした後、エタノール沈殿法で粗酸性ムコ多糖画分を分離した。次いで、この粗酸性ムコ多糖を秤量後、トリクロール酢酸（TCA）による分画法を適用して、TCA可溶性ムコ多糖画分とTCA不溶プロテオグリカン画分とに分けた（第1法）。続いて、このTCA不溶プロテオグリカン画分からアルカリ分解法でその中に含まれる酸性ムコ多糖を分離した。但し、粗酸性ムコ多糖画分が少量の場合にはTCA不溶プロテオグリカン画分も極めて少ないことがわかったので、上記両画分をまとめて定量するため直接アルカリ分解を実施してから、第1法の後半の操作を行なって酸性ムコ多糖画分を調製した（第2法）。以上の方法で得られた画分をそれぞれ正確に秤量後、100～500 μ lの水に溶解して試料液とした。
c) 酸性ムコ多糖分解酵素による消化：試料液10～20 μ lを用いて、各種酸性ムコ多糖分解酵素で消化した後、反応液に0.5 mlの水または0.05 N塩酸を含む80%エタノール溶液0.6 mlを加えて反応を止め、遠心後、上清に含まれる分解産物中の不飽和ウロン酸を232 または 235 nmの吸光度を測定して定量し、全く同様に同時に実施した標準酸性ムコ多糖の分解物についての値をもとにして酸性ムコ多糖量を求め、被検者の24時間尿中の酸性ムコ多糖量を算出した。なお、消化に用いた各種酸性ムコ多糖分解酵素は、音谷博士より供与されたコンドロイチナーゼC以外は、いずれも市販のコンドロイチナーゼACお

よびABC, ヘパリチナーゼ, ヒアルロニダーゼ(ストレプトミセス)であり,これらの酵素の消化によって,コンドロイチン硫酸AとC, デルマタン硫酸, ヘパラン硫酸および, ヒアルロン酸が定量可能である。

結 果 と 考 察

整形外科領域の疾患患者尿21例(第1法適用例6例, 第2法適用例15例)を本法で分析した結果, 次の知見を得た。a) 尿中に排泄されるTCA不溶のプロテオグリカン画分は極めて少量であった。これまで, 尿中のプロテオグリカンは全く無視されていたが, 結合組織性疾患の中には, 組織のプロテアーゼ類の異常により, 酸性ムコ多糖をプロテオグリカンの形で排泄する可能性のあるものも考えられたので第1法を開発した。今後, 本法で得られた結果を検討することによって, 組織プロテオグリカンのプロテアーゼ類による分解の様相に, 新しい手がかりを得ることも可能となった。b) 尿中のウロン酸含有酸性ムコ多糖の排泄パターンは, 他の多くの報告例と総体的には類似した傾向を示した。しかし, 内容的にはやや異なり, コンドロイチン硫酸CがAより多い例が多かった。一方, 尿中に排泄されるデルマタン硫酸の量は, 先天性ムコ多糖代謝異常症I-S(Scheie症候群)の例を除いては少なく, またヒアルロン酸量も少なかった。以上の結果, 今回分析した大部分の症例では, 尿中に排泄されるウロン酸含有酸性ムコ多糖の主成分は, コンドロイチン硫酸AとCおよびヘパラン硫酸であることが確認された。c) Scheie症候群の患者の尿では, 尿中排泄総酸性ムコ多糖量の増加と, この疾病に特徴的な尿中デルマタン硫酸およびヘパラン硫酸の著明な排泄増加が認められ, この種の疾患の尿中ウロン酸含有酸性ムコ多糖の定量には, 極めて満足すべき結果が得られた。d) 本法は, 尿中ウロン酸含有酸性ムコ多糖の, スクリーニングテスト用としても臨床検査レベルで十分活用可能な方法であることが証明された。

審 査 結 果 の 要 旨

最近ムコ多糖代謝異常症やある種の結合組織性疾患において、尿中酸性ムコ多糖の異常排泄がみられることがわかり、尿の酸性ムコ多糖の分画・定量の重要性が認識されてきている。この尿の酸性ムコ多糖の分画・定量に用いられてきた従来の分析法は複雑で一般の臨床検査とするには適当でなかった。

著者は尿中のウロン酸含有酸性ムコ多糖の分画、定量用として一般の病院の臨床検査レベルで実施可能な方法の開発を試みている。

まず被検尿を透析することなく、直接CPC溶液で酸性ムコ多糖を沈澱させ、それを酢酸カリウム溶液に溶かし、エタノール沈澱法で粗酸ムコ多糖を分離し、低分子から高分子までの酸性ムコ多糖を含む画分を分離し、ついでTCA分画法を利用してTCA可溶性酸性ムコ多糖画分とTCA不溶プロテオグリカン画分に分けた。このようにしてえられた画分をコンドロチナーゼを含む市販の酸性ムコ多糖分解酵素類を用いて、尿中のコンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルタマン硫酸、ヘパラン硫酸、並びにヒアルコン酸の酵素的定量を試みている。

著者の尿中酸性ムコ多糖の分画法は新しい方法であり、また酵素的定量法は簡便な方法である。

著者は新しく開発した方法で整形外科領域の疾患患者21例の尿について分析した結果、尿中に排泄されるプロテオグリカン画分はきわめて小量であったが、その結果を検討することで組織のプロテオグリカンの蛋白分解酵素類による分解の様相を知る可能性を示唆している。

尿中のウロン酸含有酸性ムコ多糖の排泄パターンは多くの報告と類似していたが、コンドロイチン硫酸CがAより多い例が多く、尿中に排泄されるデルタマン硫酸はscheie症候群を除いて少なく、またヒアルロン酸の量も少ないことを示している。尿中に排泄されるウロン酸含有酸性ムコ多糖の主成分はコンドロイチン硫酸AとCおよびヘパラン硫酸であることを認めている。

本論文は尿中の酸性ムコ多糖の分画に新しい方法を開拓し、一般病院の検査室でも利用できる簡便な酵素定量法を発達させたということで意味があり、充分学位に該当するものと認める。